

# Betriebsanweisung für gentechnische Arbeiten

gem. § 12 Abs. 2 GenTSV

## Sicherheitsstufe 1

Geltungsbereich: Technische Universität Braunschweig, Institut für Organische Chemie, Gebäude 4304, Räume 201, 309, 310 und 330. Die Räume sind als gentechnischer Arbeitsbereich der Sicherheitsstufe 1 gekennzeichnet.

Projektleiter: Prof. Dr. Stefan Schulz (Telefon: 7353)

BBS: Prof. Dr. Martin Bröring (Telefon: 5302)

Technische Warte: Störungsannahme Betriebstechnik (Telefon: 11)

Feuerwehr / Notfall: 0 – 112

Unfallärzte: Dr. F. Thalacker, Dr. J. Peukert, Dr. R. Sieben (Humboldtstr. 24, Telefon: 0 – 340020)

Städtisches Klinikum: Holwedestraße 16 (Telefon: 0 – 5950)

### Bezeichnung der verwendeten Mikroorganismen

Von den verwendeten Mikroorganismen geht nach Stand der Wissenschaft keine Gefährdung für Mensch und Umwelt aus.

*Bradyrhizobium japonicum*: *B. japonicum* gehört zur Familie der Rhizobien (Knöllchenbakterien) und zur Klasse der Alphaproteobakterien. Die Art ist Gram-negativ, peritrich begeißelt, aerob und chemoorganotroph auf der Basis einer Sauerstoffatmung. *B. japonicum* ist ein Bodenbakterium, das als Symbiont in Wurzelknöllchen der Sojabohne (Leguminosae) lebt. Die Bakterien besitzen in der Symbiose mit Pflanzen die Fähigkeit, molekularen Stickstoff (N<sub>2</sub>) zu Ammoniumsalzen (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) zu reduzieren. *B. japonicum* ist nach dem Stand der Wissenschaft weder für Menschen noch für Tiere oder Pflanzen pathogen.

*Escherichia coli*: *E. coli* gehört zur Familie der Enterobacteriaceae (Darmbakterien) und zur Klasse der Gammaproteobakterien. Die Art ist Gram-negativ, stäbchenförmig, peritrich begeißelt und fakultativ anaerob. *E. coli* ist ein säurebildendes (Lactose-positives) Bakterium, kommt im menschlichen und tierischen Darm vor und gehört zu den am besten untersuchten Organismen.

*Streptomyces* spp.: Streptomyceten sind Gram-positive, aerobe, Mycel-bildende, nicht-pathogene Bodenbakterien mit einem hohen GC-Gehalt, die durch einen umfangreichen Sekundärstoffwechsel gekennzeichnet sind. Viele Arten produzieren die stark erdig bzw. muffig riechenden flüchtigen Terpene Geosmin und 2-Methylisoborneol. Die folgenden Arten werden bearbeitet: *Streptomyces albus*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces ghanaensis*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces sviveus*, *Streptomyces peucetius*, *Streptomyces clavuligerus*, *Streptomyces pristinaespiralis*, *Streptomyces ambofaciens*, *Streptomyces flavogriseus*, *Streptomyces griseoflavus* und

*Streptomyces griseus*. Von sämtlichen Arten geht nach dem Stand der Wissenschaft keine Gefahr für Mensch oder Umwelt aus.

*Salinispora spp.*; Sie sind Gram-positive, aerobe, Mycel-bildende, nicht-pathogene marine Bakterien mit einem hohen GC-Gehalt, die durch einen umfangreichen Sekundärstoffwechsel gekennzeichnet sind. Viele Arten produzieren die stark erdig bzw. muffig riechenden flüchtigen Terpene Geosmin und 2-Methylisoborneol. Die folgenden Arten werden bearbeitet: *Salinispora tropica*, *Salinispora pacifica*, *Salinispora aerenicola*

Bakterien der *Roseobacter*-Gruppe: Bakterien der *Roseobacter*-Gruppe sind Gram-negative, aerobe, nichtpathogene Meeresbakterien der Alphaproteobacteria. Sie besitzen einen hohen GC-Gehalt und ein Wachstumsoptimum bei 25 – 30°C. Typische Stoffwechselwege sind der Phenylacetatabbau und der Schwefelmetabolismus, insbesondere der Abbau des Algenmetaboliten Dimethylsulfoniopropionat. Die folgenden Arten werden bearbeitet: *Pharobacter gallaeciensis*, *Oceanibulbus indolifex*, *Dinoroseobacter shibae*, *Ruegeria pomeroyi*, *Roseobacter litoralis* und *Hoeflea phototrophica*. Von sämtlichen Arten geht nach dem Stand der Wissenschaft keine Gefahr für Mensch oder Umwelt aus.

## Schutzmaßnahmen und Verhaltensregeln

Im S1-Bereich dürfen nur Personen arbeiten, die vom Projektleiter vor Arbeitsaufnahme und danach mindestens einmal jährlich an Hand dieser Betriebsanweisung unterwiesen worden sind und diese Einweisung per Unterschrift bestätigt haben. Schwangerschaften sind dem Projektleiter aufgrund der Arbeiten mit potentiell mutagenen und kanzerogenen Stoffen wie Acrylamid, Phenol und Ethidiumbromid unverzüglich mitzuteilen.

Sämtliche Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO) dürfen ausschließlich im S1-Labor (Räume 201, 309, 310 und 330) durchgeführt werden. GVOs dürfen im Raum 309 im Tiefkühlschrank (-80°C) aufbewahrt werden.

Türen und Fenster müssen während der Arbeiten geschlossen gehalten werden. Vor Beginn der Arbeit müssen sämtliche Labortüren im Aufenthaltsbereich entriegelt werden. Die Fluchtwege sind frei zu halten. Nicht nur für das Gelingen eines Experimentes, sondern auch für die Arbeitssicherheit sind optimale Sicht und Gehör wichtig. Daher muss auch tagsüber in den Laboratorien das Licht eingeschaltet werden. Das Tragen verdunkelter Brillen und das Musikhören über Kopfhörer sind im S1-Bereich untersagt. Die Laborräume müssen aufgeräumt und sauber gehalten werden. Auf den Arbeitstischen dürfen nur die tatsächlich benötigten Geräte und Materialien stehen.

Im S1-Bereich sind Schutzkittel zu tragen. Diese müssen geschlossen getragen werden, mindestens knielang sein und die Arme ganz bedecken. Die Straßenkleidung darf nicht im S1-Bereich abgelegt werden, sondern ist in einem Spind außerhalb des S1-Bereiches zu verwahren oder kann an einem Kleiderhaken vor den S1-Labors aufgehängt werden. Die Schutzkittel sind getrennt von der Straßenkleidung aufzubewahren. Beim unmittelbaren Umgang mit Mikroorganismen sind Schutzhandschuhe zu tragen. Essen, Trinken, Rauchen, Schnupfen und Schminken sowie die Aufbewahrung von Nahrungs- und Genußmitteln und Kosmetika in der gentechnischen Anlage sind verboten.

Mundpipettieren ist untersagt. Spritzen und scharfkantige Gegenstände sollen nur wenn unbedingt nötig benutzt werden. Nach Gebrauch sind sie in einem dafür vorgesehenen stichfesten Behälter zu sammeln und darin zu entsorgen. Bei allen Arbeiten ist darauf zu achten, dass Aerosolbildung soweit möglich vermieden wird.

Die Identität der benutzten Organismen ist regelmäßig z. B. mit dem Mikroskop in Raum 330 zu überprüfen. Nach Beendigung der Arbeiten sind die Organismen sachgerecht aufzubewahren oder in geeigneter Weise zu beseitigen. Die Lagerung von gentechnisch

veränderten Organismen erfolgt im Tiefkühlschrank ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) in Raum 309 in beschrifteten Behältern. Die Lagerung ist im Rahmen der Aufzeichnungen nach der Gentechnik-Aufzeichnungsverordnung (GenTAufzV) zu dokumentieren. Aus der Beschriftung der Kulturen müssen eindeutig der Organismus, enthaltene Vektoren und der Experimentator hervorgehen. Anderweitig gelagerte oder unvollständig beschriftete Behälter werden ohne weitere Rückfragen durch den Projektleiter vernichtet. Dem Beauftragten für Biologische Sicherheit wird darüber schriftlich Mitteilung gemacht.

Werden organismenhaltige Flüssigkeiten auf Labortischen oder auf dem Fußboden verschüttet, müssen die Flüssigkeiten mit Fließpapier aufgesaugt, dieses autoklaviert und die Oberflächen sofort mit 70% Ethanol desinfiziert werden. Dabei sind Schutzhandschuhe zu tragen. Beim Gebrauch von alkoholischen Desinfektionsmitteln sind folgende Vorgaben einzuhalten:

1. Die zu reinigende Fläche darf höchstens  $2\text{ m}^2$  betragen.
2. Pro  $\text{m}^2$  dürfen nicht mehr als 50 mL Desinfektionsmittel verwendet werden.
3. Es dürfen keine Zündquellen (wie z. B. offene Brennerflamme) in der Nähe sein.
4. Die Fläche darf nicht wärmer als  $37^{\circ}\text{C}$  sein.

Zentrifugenbecher für Festwinkelrotoren dürfen nur bis zu einer Höhe mit Bakterienkulturen gefüllt werden, die ein Überlaufen während der Zentrifugation nicht erlaubt. Sollte es trotzdem zu einem Auslaufen kommen, muss die organismenhaltige Flüssigkeit mit Fließpapier aufgesaugt werden, das anschließend autoklaviert werden muß. Der Rotorraum der Zentrifuge und der Rotor müssen mit 70% Ethanol desinfiziert werden. Dabei sind Schutzhandschuhe zu tragen.

Sämtliche Arbeiten mit Ethidiumbromid sind im speziell gekennzeichneten Abzug in Labor 201 durchzuführen. In diesem Abzug dürfen keine sonstigen nicht im Zusammenhang mit Gelelektrophoresen stehenden Arbeiten durchgeführt werden oder Gegenstände bereitgestellt oder gelagert werden.

Nach Beendigung der Tätigkeit und vor Verlassen des Arbeitsbereiches müssen die Hände ggf. desinfiziert, sorgfältig gewaschen und rückgefettet (Hautschutzplan) werden.

## **Aufzeichnungen**

Vor Beginn gentechnischer Arbeiten veranlasst der Projektleiter die Erstellung der Aufzeichnungen gemäß GenTAufzV auf Grundlage des Formblattes Z und bestätigt die Richtigkeit der Aufzeichnungen durch seine Unterschrift. Die erteilte Zustimmung ist diesen Aufzeichnungen beizufügen. Die Aufzeichnungen sind gem. § 3 Abs. 7 GenTAufzV fortlaufend und zeitnah zu führen.

Die Verwendung neuer Spender, Empfänger und Vektoren begründet in der Regel eine weitere gentechnische Arbeit, über die ebenfalls Aufzeichnungen zu führen sind. Informationen über die verwendeten Spender, Vektoren und Empfänger sind diesen Aufzeichnungen beizufügen.

Aufzeichnungen müssen bis zum Abschluss der Arbeiten und anschließend noch 10 Jahre aufbewahrt werden. Die Aufbewahrung der Aufzeichnungen erfolgt im Sekretariat des Projektleiters (Raum 322).

## **Transport, Entsorgung und Desinfektion**

S1-Organismen dürfen außerhalb der gentechnischen Anlage nur in bruch sicheren, geschlossenen und gekennzeichneten Behältnissen transportiert werden. Dies gilt auch für GVO-haltige Abfälle.

Alle mit gentechnisch veränderten Organismen kontaminierten Abfälle, bei denen nicht gewährleistet ist, dass keine schädliche Auswirkung auf Rechtsgüter nach § 1 Nr. 1 GenTG zu erwarten sind, müssen für 20 Minuten bei 121° C autoklaviert werden. Ein Autoklav befindet sich in Raum 330. Danach können sie mit den normalen Laborabfällen entsorgt werden.

Kontaminiertes Einwegmaterial (z. B. Pipettenspitzen) wird in den dafür vorgesehenen Autoklavierbehältern gesammelt und anschließend autoklaviert. Bakterienhaltige Pellets, die bei Zentrifugationen anfallen, werden mit etwas Flüssigkeit suspendiert, in ein Glasgefäß überführt und anschließend autoklaviert. Kontaminierter Flüssigabfall wird in Glasgefäßen gesammelt und autoklaviert.

Sämtliche Geräte, die mit gentechnisch veränderten Organismen in Berührung gekommen sind, sind anschließend zu autoklavieren oder chemisch mit 70% Ethanol zu desinfizieren. Bei der Desinfektion von Glaspipetten mit 70% Ethanol für 10 min ist darauf zu achten, dass die Pipetten vollständig von der Desinfektionslösung bedeckt sind.

Die Bedienungsanleitung für den Autoklaven ist bei der Benutzung zu befolgen. Die Funktionsweise des Autoklaven muss vor Inbetriebnahme durch den Projektleiter erklärt worden sein. Beim Betrieb des Autoklaven sind die Vorschriften der Betriebssicherheitsverordnung zu beachten.

## **Verhalten im Gefahrfall**

Erste-Hilfe-Kästen befinden sich in Raum 330.

Notruf: 0-112 (von jedem Telefon)

## **Verhalten bei Verletzungen**

Im Verletzungsfall sollen kontaminierte Hautstellen mit der in den Spendern befindlichen Desinfektionslösung desinfiziert werden, die in sämtlichen Räumen des S1-Bereiches zur Verfügung stehen.

Augen und Schleimhäute sollen ausgiebig (mindestens 5 Minuten) mit viel fließendem Wasser gespült werden. Augenduschen befinden sich neben den Waschbecken in allen Räumen des S1-Arbeitsbereiches. Vor Aufnahme der Arbeiten ist vom Projektleiter eine Einweisung in die Funktion der Augenduschen zu erteilen. Die Funktionsfähigkeit der Augenduschen ist einmal monatlich durch eine vom Projektleiter bestimmte Person zu überprüfen und durch Unterschrift auf einem Kontrollblatt zu protokollieren. Dabei müssen die Augenduschen durch mindestens einminütigen Betrieb ausgiebig gespült werden.

Treten trotz dieser Sofortmaßnahmen weitere gesundheitliche Beschwerden auf, so ist umgehend ein Unfallarzt oder das städtische Klinikum aufzusuchen. Konsultierte Ärzte sind über die Möglichkeit einer Infektion mit biologischem Material zu unterrichten.

## **Verhalten bei Feuer**

Kann ein Feuer nicht selbst durch die vorhandenen Feuerlöschmittel bekämpft werden, muß unverzüglich die Feuerwehr benachrichtigt werden. Oberstes Gebot ist in jedem Fall die eigene Sicherheit und die Sicherheit anderer anwesender Personen.

Als Hauptfluchtweg ist eines der direkt benachbarten Treppenhäuser zu benutzen. Der Fahrstuhl darf im Brandfall nicht verwendet werden.

Feuerlöscher befinden sich in allen Räumen des S1-Arbeitsbereiches sowie in den Fluren vor den entsprechenden Laboratorien.

Falls Kleidung Feuer gefangen hat ist eine Löschdecke oder eine Personendusche zu benutzen. Löschdecken und Körperduschen befinden sich in allen Räumen des S1-Arbeitsbereiches. Die Funktionsfähigkeit der Körperduschen ist einmal monatlich durch eine vom Projektleiter bestimmte Person zu überprüfen und durch Unterschrift auf einem Kontrollblatt zu protokollieren.

Durch Betätigen eines Notschalters kann sowohl das Gas als auch der Strom in den Labors abgestellt werden. Derartige Notschalter befinden sich an allen Ausgängen der Labors des S1-Arbeitsbereiches sowie auf den Fluren.

Nach leichten Verbrennungen und Verbrühungen sind die betroffenen Hautpartien unverzüglich mindestens 10 Minuten unter fließendes kaltes Wasser oder in Eis zu halten.

Der Projektleiter, 1.7.2015

(Prof. Dr. Stefan Schulz)